



UNIVERSIDAD ANDRES BELLO

Facultad de Ingeniería

Algoritmo de Fragmentación de Ligandos con un Enfoque Fragment-Based Drug Design (FBDD)

Autor: Daniel Andrés Díaz Milla

Profesor Guía: Roberto León Vásquez

Tesis para optar al Título de Ingeniero en Computación e
Informática.

Viña del Mar - Chile

Diciembre - 2018

Índice general

Índice de figuras	3
Índice de tablas	7
Capítulo 1. Introducción	9
1.1. Sobre el proyecto	10
1.2. Contexto general	10
1.3. Ligandos	12
1.4. Pockets	12
1.5. Molecular Docking	12
1.6. Fragmentación de Ligandos y Reglas	13
1.7. HSP-90	14
1.8. Definición del Problema	14
1.9. Objetivo General	17
1.10. Objetivos Específicos	17
Capítulo 2. Marco Teórico	19
2.1. Métodos basados en integración	20
2.2. Métodos de pseudo receptor	20
2.3. Estrategias basadas en estructura y Molecular docking.	23
2.4. El enfoque de deconstrucción-reconstrucción	28
Capítulo 3. Metodología	33
3.1. Definición del Método y Enfoque.	34
3.2. Reglas y Restricciones	34
3.3. Construcción de librería de fragmentos	35
3.4. Técnicas Utilizadas	35
3.5. Iteraciones de codificación	40

3.6. Casos de prueba	40
3.7. Resultados esperados	40
3.8. Trazabilidad	41
Capítulo 4. Resultados	43
4.1. El algoritmo	44
4.2. Caso de prueba 1	45
4.3. Caso de prueba 2	50
4.4. Caso de prueba 3	52
4.5. Trazabilidad de los casos de prueba	55
Capítulo 5. Conclusiones	57
5.1. Conclusiones	58
Bibliografía	61

Índice de figuras

1.1.Cifras en Chile <i>Cifras del cáncer de mamas en Chile, 2017</i>	11
1.2.Proceso de Molecular Docking. (A) <i>La estructura tridimensional del ligando;</i> (B) <i>La estructura tridimensional del receptor;</i> (C) <i>El ligando es acoplado en la cavidad de unión del receptor y se exploran las conformaciones putativas;</i> (D) <i>Se identifica la conformación de unión más probable y sus respectivas interacciones intermoleculares.</i>	13
2.1.Ejemplo de SIFt fingerprint. <i>Esquema de clasificación integrando los métodos en base a estructura y en base a ligandos. La clasificación principal es en dos categorías, que incluye métodos basados en interacción y en el docking. Cada una de estas categorías además contiene dos subcategorías: Métodos de pseudo receptores y métodos basados en fármacos / fingerprints, para los métodos basados en interacción y posee métodos de virtual screening basados en estructura y ligando y métodos basados en similitud de puntaje en el docking, para los modelos de similaridad.</i>	21
2.2.Diferentes tipos de métodos de pseudo receptor. <i>Para la comparación, se muestra el complejo asociado de proteína-ligando de trombina (código PDB [78,201]: 1mu6 [126]).</i>	22
2.3.Esquema del SBDD <i>La estructura tridimensional del objetivo molecular es empleada en los estudios de modelado molecular. Los compuestos prometedores son sintetizados y posteriormente evaluados. Dado que se descubren moléculas pequeñas bioactivas, se puede obtener la estructura de un complejo ligando-receptor. El complejo de unión se usa en estudios de modelado molecular y se diseñan nuevos compuestos.</i>	24
2.4.Búsqueda conformacional. <i>Una molécula contiene dos grupos voluminosos (morado y verde), tienen su orientación definida por los dos diedros internos 1 y 2</i>	25

2.5.Búsqueda conformacional. <i>El algoritmo de búsqueda sistemática cambia todos los parámetros estructurales hasta alcanzar el mínimo de energía local o global</i>	26
2.6.Búsqueda conformacional. <i>La búsqueda estocástica explora el espacio y genera al azar distintas conformaciones, poblando el paisaje energético. Este procedimiento aumenta considerablemente la probabilidad de hallar un mínimo de energía global.</i>	26
2.7.El método de construcción incremental.. (A) <i>El ligando es fragmentado; (B) Un fragmento es acoplado en el pocket; (C) El siguiente fragmento es acoplado al primero; (D) y (E) Los demás fragmentos son acoplados secuencialmente para construir el ligando completo en su sitio de unión.</i>	27
2.8.Enfoque de deconstrucción-reconstrucción. <i>Representación sistemática del enfoque de deconstrucción-reconstrucción en el diseño de fármacos basado en estructura.</i>	30
2.9.Enfoque de deconstrucción-reconstrucción. <i>Diagrama de flujo del enfoque de deconstrucción-reconstrucción en FBDD.</i>	31
2.10 Descubrimiento de HJC0122 y HJC0124. (a) <i>Análisis de superposición de las nueve PAM conocidas con PDB disponibles. (b) Enfoque general de deconstrucción-reconstrucción. (c) Modo de unión predicho de HJC0122 (rosa). (d) Modulación del efecto de AMPA sobre la actividad inducida. Recuadro de estructuras químicas de los agentes sintetizados [27].</i>	32
3.1. Diagrama de procesos construcción de algoritmo.	36
3.2. Ciclos de un ligando. <i>Ligando que posee tres Ciclos: Ciclo1, Ciclo2 y Ciclo3</i>	39
4.1. Modelo de caja negra. <i>Entra un fichero .pdb y se fragmenta en "n" nuevos fragmentos en formato .sdf, validos para visualización en pymol y de entrada para una reconstrucción.</i>	46
4.2. Salida por consola. <i>La salida por consola de la ejecución del algoritmo, se recalca el peso molecular de fragmento</i>	46
4.3. Amiloxate. <i>Compuesto químico de entrada al algoritmo</i>	47
4.4. Fragmentos en Pymol <i>Visualización en Pymol uno de los fragmentos de salida del algoritmo</i>	47
4.5. Salida por consola. <i>Salida por consola de las dos reglas ya implementadas.</i>	48

4.6..pdb de uno de los fragmentos. <i>Resultado correspondiente a la salida del algoritmo en .sdf de uno de los fragmentos que respeta dos reglas de fragmentación.</i>	48
4.7.Entrada del algoritmo <i>Visualización del compuesto de entrada para la fragmentación</i>	49
4.8.Salida de la fragmentación <i>Resultado de la fragmentación producto de dos reglas ya implementadas, cuenta con 1 fragmento válido(según reglas), visualizados en Pymol</i>	49
4.9.Estructura de entrada <i>Estructura del .pdb de la entrada del algoritmo.</i>	51
4.10Salida primer fragmento <i>Estructura del .sdf de la salida del primer fragmento.</i>	51
4.11Salida segundo fragmento <i>Estructura del .sdf de la salida del segundo fragmento (Fragmento no válido por reglas).</i>	51
4.12Tercer fragmento sdf <i>Estructura del .pdb de la salida del tercer fragmento transformado con OpenBabel a formato .sdf</i>	52
4.13Ligando frag-3k99 <i>Visualización en pymol del ligando</i>	53
4.14Salida por consola <i>Salida por consola una vez ejecutado el algoritmo de fragmentación</i>	53
4.15Salida por consola <i>Salida por consola una vez ejecutado el algoritmo de fragmentación</i>	54
4.16Salida por consola <i>Salida por consola una vez ejecutado el algoritmo de fragmentación</i>	54
4.17Obj02.pdb <i>Visualización en Pymol del ligando afín a la HSP-90.</i>	55
4.18Salida por consola de ejecución del algoritmo <i>Salida por consola del algoritmo, con la entrada del ligando obj02</i>	55
4.19Salida2Sdf.sdf <i>Único fragmento válido producto de la entrada.</i>	56

Índice de tablas

2.1.Pros y contras de varios métodos FBS.. <i>HCS, high concentration screening; ITC, isothermal titration calorimetry; MS, mass spectrometry; SPR, surface plasmon resonance; TSA, thermal shift assay; VS, virtual screening; XRC, x-ray crystallography.</i>	30
3.1.Primera parte estructura .pdb	36
3.2.Segunda parte estructura .pdb	36
3.3.Matriz de trazabilidad Objetivos vs Tareas	41
4.1.Trazabilidad Casos de Prueba / Implementaciones	56
5.1.Matriz de trazabilidad Objetivos vs Tareas	58
5.2.CheckList de objetivos específicos y su cumplimiento	59

Capítulo 1

Introducción

1.1. Sobre el proyecto

Antes de exponer el contexto general, es necesario recalcar que este proyecto está siendo trabajado en conjunto con un equipo multidisciplinario, que consiste en un núcleo de investigación. Este núcleo consta de 3 equipos: El equipo de informática, el equipo de química y el equipo de biología. En el equipo de informática se trabajarán separadamente dos algoritmos, el primero de estos trabajado en el transcurso de esta memoria, y el segundo trabajado por otro miembro del equipo de informática.

1.2. Contexto general

En Chile, el cáncer de mamas es el cáncer más presente en mujeres, siendo además la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, además de otras cifras que pueden ser vistas en la Figura 1.1.

Cuando el cáncer de mamas está presente, ocurre una sobre expresión de cierta proteína, que se encarga de ayudar al cáncer de mamas, proporcionando a este energía y otros factores que potencian al cáncer, teniendo como consecuencia directa el que se produzca una resistencia a las terapias, siendo la más afectada la terapia hormonal.

En la actualidad, la investigación farmacéutica para fármacos con estrategias computacionales ha incorporado con gran éxito una serie de métodos de modelado molecular, en conjunto con el uso de una extensa variedad de programas para el descubrimiento de drogas, para estudiar las complejas interacciones de los sistemas biológicos y químicos [1].

Para llevar a cabo la investigación para el descubrimiento de nuevos fármacos, ha sido absolutamente necesaria la integración de estrategias computacionales para la investigación y desarrollo de nuevos compuestos que resultan prometedores.

En general, los métodos computacionales utilizados para realizar las investigaciones de nuevos candidatos a fármacos, se pueden dividir en dos grandes categorías [2]:

- En base a estructuras.
- En base a ligandos.

La estrategia en base a estructuras, se utiliza normalmente cuando existe una suficiente información estructural de la proteína objetivo, especialmente cuando existe una estructura

El **cáncer de mama** es el más frecuente en mujeres:

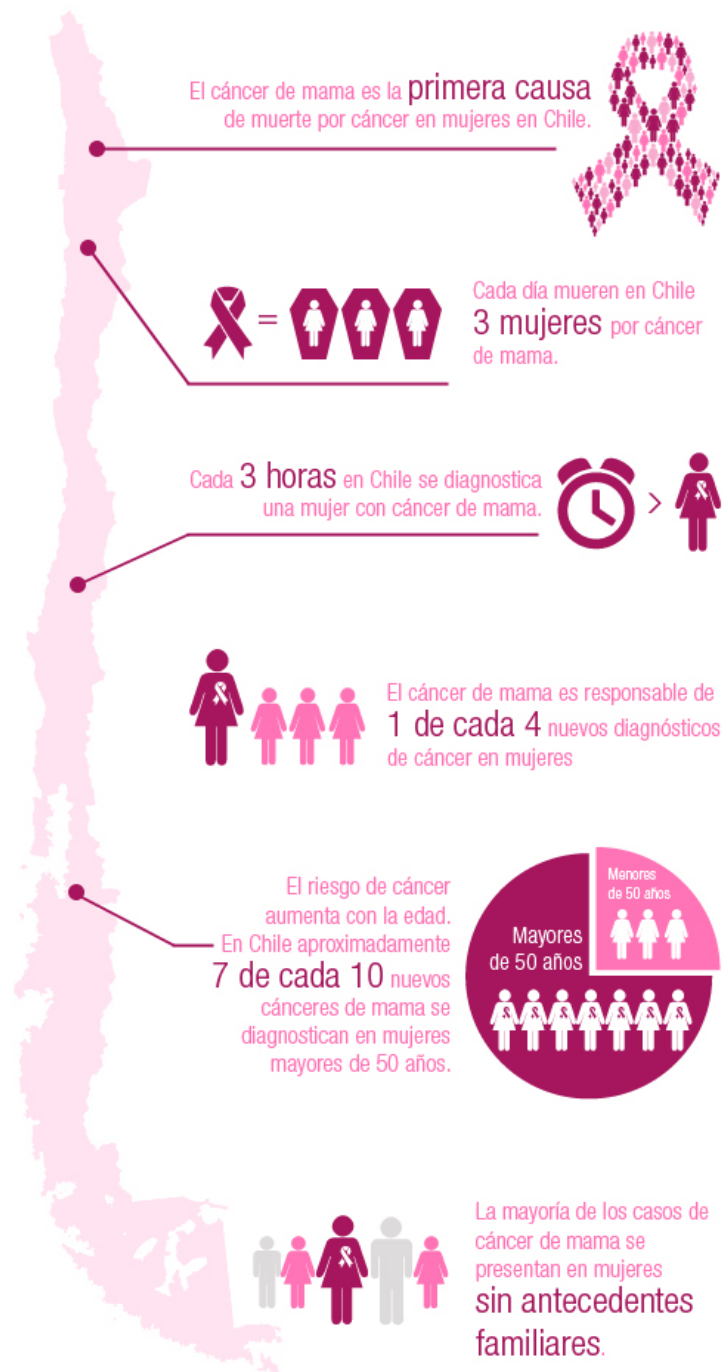


FIGURA 1.1. Cifras en Chile *Cifras del cáncer de mamas en Chile, 2017*

de cristal disponible. Esta estrategia consiste en pocas palabras, en una simulación de las interacciones entre la proteína y un ligando.

En lo que respecta al diseño de drogas en base a ligandos, los esfuerzos se centran principalmente en el análisis de las propiedades químicas y biológicas de un set de ligandos. Este método se utiliza a menudo cuando la información de la estructura de la proteína objetivo es muy poca o nula.

Para esta investigación, se utilizará la primera estrategia descrita en este punto, esta es: en base a la estructura. Se ha decidido por utilizar esta estrategia puesto que la proteína objetivo es muy conocida y presenta su estructura cristalizada. Esta proteína es la HSP-90 cristalizada.

1.3. Ligandos

En esencia, los ligandos son pequeñas moléculas que desencadenan interacciones entre o dentro de las células. Los ligandos ejercen sus efectos uniéndose a proteínas celulares objetivas, específicamente a unas cavidades de estas llamadas “pockets” [3].

1.4. Pockets

Los pockets, son específicamente sectores receptores objetivo de una determinada proteína. Estos pocket están formados por aminoácidos y tienen en sus principales características, que pueden realizar interacciones químicas, energéticas, electrónicas con ligandos. En este proyecto se trabajará con el pocket de la proteína de investigación HSP90 cristalizada.

1.5. Molecular Docking

Molecular docking consiste en la búsqueda de ligandos que calcen en sitios objetivos llamados pockets, teniendo en cuenta las variadas interacciones que ocurren entre ligando y pocket [1]. El docking molecular es uno de los métodos más utilizados en la estrategia de diseño en base a estructura, por su habilidad de predecir con un sustancial grado de efectividad, la conformación de pequeñas moléculas ligandos dentro de un sitio de unión objetivo (Figura 1.2)[1].

La identificación de las conformaciones de unión más probables requieren de dos pasos:

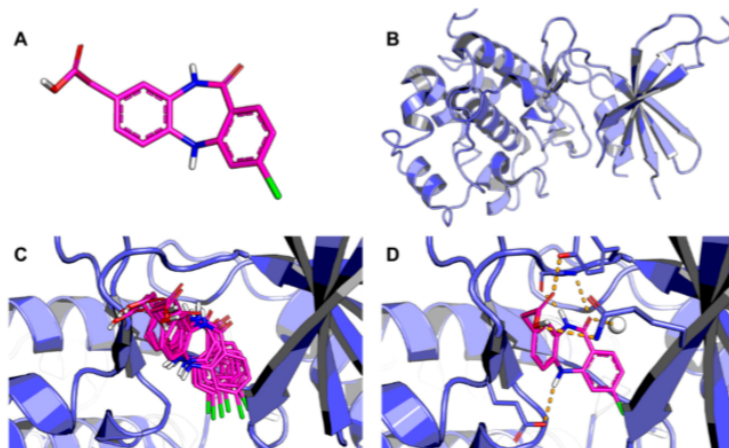


FIGURA 1.2. Proceso de Molecular Docking. (A) *La estructura tridimensional del ligando*; (B) *La estructura tridimensional del receptor*; (C) *El ligando es acoplado en la cavidad de unión del receptor y se exploran las conformaciones putativas*; (D) *Se identifica la conformación de unión más probable y sus respectivas interacciones intermoleculares*.

- La exploración de un gran espacio conformacional que represente varias puntos potenciales de unión.
- Predicción precisa de la interacción energética asociada a cada una de las conformaciones de unión detectadas.

1.6. Fragmentación de Ligandos y Reglas

En las últimas décadas, se han desarrollado una serie de métodos y enfoques útiles para identificar los compuestos que tienen un gran potencial de generar nuevas drogas. Uno de estos enfoques, que ha estado ganando fuerza, corresponde al diseño de fármacos con un enfoque basado en fragmentos (FBDD), el cual ha dado paso a un rápido y eficiente progreso en el descubrimiento de nuevas drogas [7].

El FBDD es en la actualidad una de los métodos para el descubrimiento de nuevas drogas más importantes [7]. El diseño de drogas basado en fragmentos, consiste a grandes rasgos en tomar un determinado set de ligandos y aplicar una serie de reglas y restricciones para dividir estos ligandos en un set de nuevos fragmentos. Entre las reglas encontramos un conjunto de 3, las cuales son denominadas RO3 (Rule of Three):

- Peso molecular: Este debe ser menor a 300

- Dadores y recibidores de hidrógeno: Cada uno debe ser menor o igual a 3.
- cLogP: Coeficiente que representa la capacidad de un compuesto químico para atravesar la membrana celular, debe ser menor o igual a 3.

1.7. HSP-90

La HSP90 es una proteína abundante en las células eucarióticas. Numerosos estudios han demostrado la sobre exposición de HSP90 en diversos tumores y células cancerígenas [4]. Según estudios, la proteína en cuestión potencia la evolución de la resistencia a la terapia hormonal en modelos de cáncer de mama humano. Estudios han comprobado que una leve inhibición de la HSP90 afecta la resistencia a anti estrógenos en modelos del cáncer de mama. Aunque el grado de inhibición cayó por debajo del umbral para la activación proteo tóxica, y no tuvo una actividad anticancerígena en sí, esta leve inhibición disminuyó drásticamente la aparición de resistencia a los antagonistas hormonales tanto en nivel celular, como en ratones de experimentación [5].

1.8. Definición del Problema

En la química computacional, se tiene la principal problemática de encontrar ligandos candidatos a inhibidores de proteína, especialmente la proteína objetivo HSP90 cristalizada. A pesar de que existen una serie de técnicas que están siendo utilizadas constantemente en las investigaciones para la búsqueda de candidatos a fármacos, se encuentran en estas constantes dificultades entre las cuales destacan [1]:

- Problemas de computación como la explosión combinatoria, ocurrente en algunos programas de docking utilizados, debido a la gran cantidad de posibles combinaciones para encontrar candidatos, estos problemas son solucionados en algunos algoritmos, con la utilización de algoritmos genéticos.
- El mayor problema de la estrategia basada en estructura: dificultades a la hora de la identificación y caracterización del sitio de unión objetivo de interacción con el ligando, así como la evaluación de su potencial para la interacción con componentes compuestos de moléculas más pequeñas. Las superficies de contacto en las que dos proteínas interactúan entre sí son muy diferentes a las cavidades de unión ligando-proteína.

Así mismo, el mayor problema en la investigación de fármacos con estrategias computacionales y el objetivo de esta investigación, consiste en encontrar eficientemente los ligandos candidatos para la sintetización de drogas con sus respectivas interacciones en los pocket, centrada principalmente en las interacciones que se producen en estos últimos.

1.8.1. Justificación del Problema. Tal como se mencionó anteriormente en el punto 2.1, existen una serie de problemas y desafíos al momento de encontrar potenciales ligandos candidatos para inhibidores de proteína. Uno de los puntos de este trabajo de investigación consiste en atacar ese problema desde un enfoque de FBDD, definido más adelante en el marco teórico, que consiste en fragmentar ligandos utilizando las reglas RO3, evaluar interacciones y posteriormente reconstruir nuevos ligandos con los mejores fragmentos [7], que consiste más que nada en una combinación de estrategias computacionales y una serie de algoritmos aplicados que han sido desarrollados para atacar la problemática desde una diversidad de ángulos.

Algunos de estos métodos utilizados actualmente implican interacciones manuales entre el usuario y el software, como por ejemplo el método de fragmentación, el cual consiste en dividir el ligando manualmente en dos fragmentos independientes, paradigma que es aplicado también en el pocket [6].

El Docking molecular está catalogado como un problema de búsqueda geométrica. Los grados de libertad a considerar son la orientación relativa de las dos moléculas que interaccionan, así como sus conformaciones. Para la proteína, en este caso se conoce muy bien su estructura molecular, pero no el ligando.

Es sumamente importante además, que la atención se centra principalmente en el sitio de unión del ligando, que en casi todos los casos corresponde a una región cóncava de la superficie de la proteína, como una cavidad [6], conocida como pocket.

1.8.2. Preguntas de Investigación. Existe un método que atrae la atención para atacar el problema, esta estrategia corresponde a una deconstrucción-reconstrucción, o también FBDD, que a grandes rasgos consiste en la deconstrucción de una molécula en una serie de fragmentos, para estudiar sus interacciones individuales con la proteína en el pocket objetivo [7].

Se pretende utilizar este paradigma para el resolver el problema y así estudiar las interacciones energéticas de estos fragmentos con la proteína objetivo, de forma que sea posible descubrir a los mejores ligandos candidatos para el sitio objetivo.

En base a lo planteado anteriormente, sumado a la problemática planteada en 2.1, se tienen las siguientes preguntas de investigación:

- Considerando construir una base de datos de fragmentos con las peores interacciones energéticas en el sitio objetivo, ¿Cómo afecta el tener esta información, en nuevas iteraciones del algoritmo?
- Disminuyendo el costo computacional para armar la librería de fragmentos, ¿Es posible encontrar un mayor número de ligandos candidatos?

1.9. Objetivo General

Desarrollo de un algoritmo de fragmentación de ligandos utilizando un enfoque FBDD, para construir una librería de fragmentos.

1.10. Objetivos Específicos

- Diseñar un algoritmo para la fragmentación de ligandos, centrándose únicamente en la evaluación de las reglas RO3.
- Construcción de una librería de fragmentos a partir de un enfoque de deconstrucción-reconstrucción [7], para obtener un 20 % más de fragmentos viables que las soluciones actuales.
- Disminuir el costo computacional de la construcción de la librería de fragmentos en un 20 %.

Capítulo 2

Marco Teórico

En esta sección se hará una detallada revisión de los diversos métodos que son utilizados en la actualidad para solventar la problemática de encontrar potenciales ligandos candidatos que interaccionen en los sitios objetivos de las proteínas. Se estudiarán los métodos más conocidos y utilizados, haciendo una review de estos detallando sus principales características y algunos de sus resultados.

2.1. Métodos basados en integración

Una clase importante de métodos que integran los dos métodos: basado en ligandos y basados en estructura, se basa en comparar y/o modelar las interacciones entre proteína-ligando a través de sistemas similares de proteína-ligando. El principal objetivo radica en identificar las interacciones clave ligando-proteína de la data fisicoquímica disponible y utilizar los datos de interacción obtenidos para identificar ligandos con interacciones similares. Este tipo de método de integración puede ser dividido en dos subcategorías (Figura 2.1). La primera subcategoría, técnicas de pseudo receptor, correlaciona las similitudes entre ligandos con la actividad biológica medida y establecen una representación estructural del pocket de unión entre proteína-ligando. El resto del conjunto de técnicas es el inverso del de la primera categoría. Estos métodos analizan las interacciones proteína-ligando de los datos estructurales para extraer las interacciones clave entre estos, para luego traducir esas interacciones en representaciones matemáticas simplificadas que son utilizadas por métodos basados en similitud, para detectar potenciales compuestos activos de una librería de ligandos. Muchas técnicas de esta categoría se basan en modelos de fingerprint o modelos farmacológicos [2].

2.2. Métodos de pseudo receptor

Los métodos de pseudo receptores son, en primera instancia extensiones de técnicas QSAR, tales como por ejemplo GOLPE [8]. Estas técnicas de QSAR toman la información fisicoquímica y la sitúa en un espacio 3D rodeando a un conjunto de compuestos de referencia alineados, que se unen en el mismo sitio de unión de un objetivo macro molecular común o bien, en el mismo pocket de una proteína.

En esencia, los métodos de pseudo receptor amplían este mapeo al intentar crear modelos tridimensionales del sitio de unión (pocket) de la proteína objetivo del conjunto de ligandos potenciales. Estos modelos representativos de pseudo receptor poseen el objetivo de contener

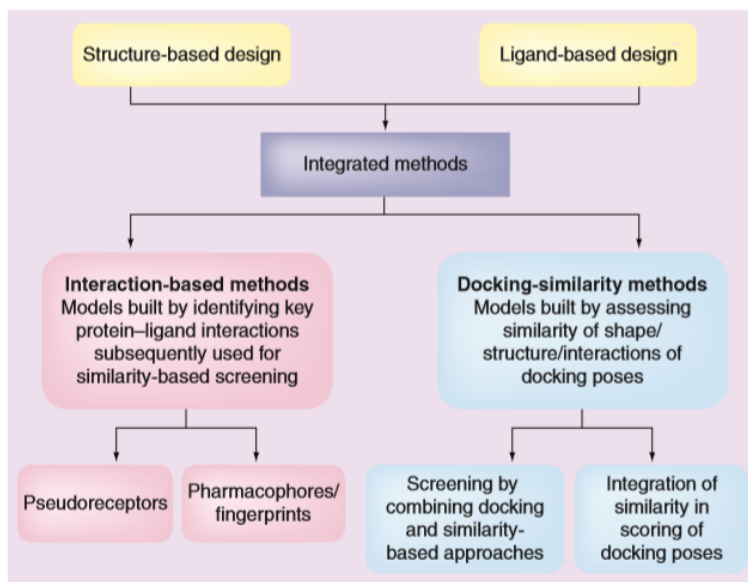


FIGURA 2.1. Ejemplo de SIFT fingerprint. *Esquema de clasificación integrando los métodos en base a estructura y en base a ligandos. La clasificación principal es en dos categorías, que incluye métodos basados en interacción y en el docking. Cada una de estas categorías además contiene dos subcategorías: Métodos de pseudo receptores y métodos basados en fármacos / fingerprints, para los métodos basados en interacción y posee métodos de virtual screening basados en estructura y ligando y métodos basados en similitud de puntaje en el docking, para los modelos de similitud.*

interacciones clave entre la proteína y el ligando, y a mapear el volumen y la forma en la que se producen estas interacciones electroquímicas.

Principalmente, el objetivo de modelado de pseudo receptores consiste en generar sustitutos de la estructura tridimensional del sitio de unión de la proteína que se puede utilizar para el diseño de fármacos basado en estructura, y además, predecir las afinidades entre pocket de la proteína y los potenciales ligandos que interactúan con esta.

Los métodos de pseudo receptores pueden ser divididos en seis categorías: basados en grillas, basados en particiones, basados en péptidos, pasados en (iso) superficies, basados en átomos y basados en fragmentación (Figura 2.2) [9] .

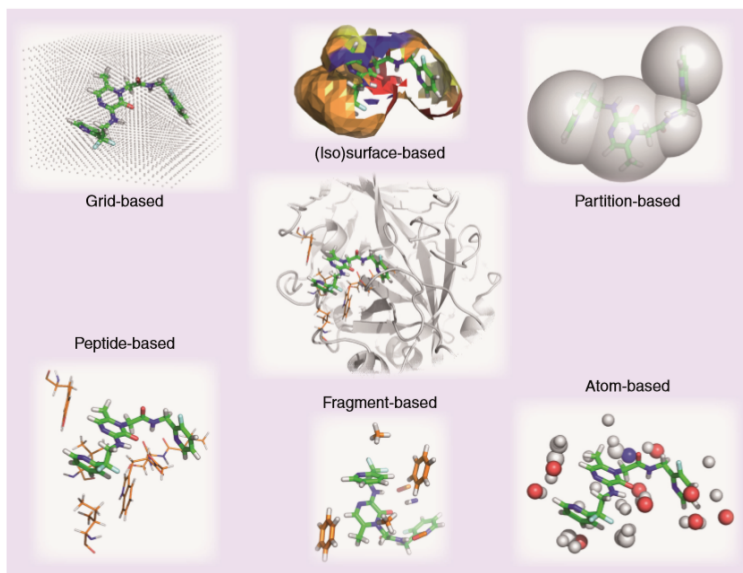


FIGURA 2.2. Diferentes tipos de métodos de pseudo receptor. *Para la comparación, se muestra el complejo asociado de proteína-ligando de trombina (código PDB [78,201]: 1mu6 [126]).*

2.2.1. Métodos basados en grilla. En estos, se inserta una cuadrícula uniformemente espaciada alrededor del conjunto de ligandos. Las propiedades fisicoquímicas deseadas, como la electrostática se mapean en cada punto de intersección de la grilla.

2.2.2. Métodos basados (iso) superficie. Consiste en una selección de las superficies, como la superficie accesible al disolvente, que representa el espacio 3D más crítico para las interacciones proteína-ligando.

2.2.3. Métodos basados en particiones. En los métodos basados en particiones, el espacio ambiental del ligando se divide en subsitios más pequeños que representan las interacciones clave proteína-ligando.

2.2.4. Métodos basados en péptidos. Los aminoácidos completos se colocan alrededor del conjunto de ligandos que representan los aminoácidos del sitio de unión.

2.2.5. Métodos basados en átomos. Para estos métodos, se pueden considerar colocar (pseudo) átomos alrededor del conjunto de ligandos. Las interacciones entre esos (pseudo) átomos y los ligandos se calculan tomando en cuenta alguna topología de campos de fuerza.

2.2.6. Métodos basados en fragmentos. Los conceptos basados en fragmentos son enfoques intermedios entre los métodos basados en átomos y los basados en péptidos. Aquí, pequeños fragmentos hidrófilos e hidrófobos se colocan alrededor del conjunto de ligandos, imitando los grupos funcionales de aminoácidos apropiados.

2.3. Estrategias basadas en estructura y Molecular docking.

Como en este proyecto se pretende principalmente utilizar una estrategia basada en estructura, puesto que la principal condición para esto es el conocimiento íntegro de la estructura de la proteína objetivo, en este caso la HSP90, más acotado a su pocket principal, estructura cristalizada que es ampliamente conocida y documentada en el ámbito químico y químico computacional, se profundizará más a fondo en este punto con las diversas estrategias aplicadas para el docking molecular.

2.3.1. Diseño de drogas basado en estructura (SBDD). Para el diseño computacional de nuevas drogas, es absolutamente necesario comprender los principios por los cuales los ligandos reconocen e interactúan con las macromoléculas es de gran importancia en la investigación y desarrollo de compuestos farmacéuticos (I + D) [10].

El SBDD se refiere al uso sistemático de datos estructurales que son obtenidos normalmente por la experimentación o por modelamientos computacionales.

El motivo de ser del SBDD corresponde a concebir ligandos potenciales con sus debidos atributos electrostáticos y estereoquímicos, para lograr una alta afinidad con el receptor objetivo. La disponibilidad de un modelo tridimensional de las estructuras macro molecular, la topología del sitio objetivo, las cavidades y los sub-pockets son cruciales y cuidadosamente examinadas. Los métodos actuales de SBDD contienen las características necesarias para la eficiente modulación del receptor(pocket) objetivo[10][11].

El SBDD es un proceso cíclico que a grandes rasgos consiste en la adquisición gradual del conocimiento (Figura 2.3). Comenzando por una estructura objetivo conocida para identificar posibles ligandos potenciales. Estos procedimientos de modelado son seguidos por una síntesis de los compuestos más promisorios

Luego, se evalúan las propiedades biológicas, como la potencia, afinidad y eficacia. Siempre y cuando se identifiquen compuestos activos, la estructura tridimensional del complejo

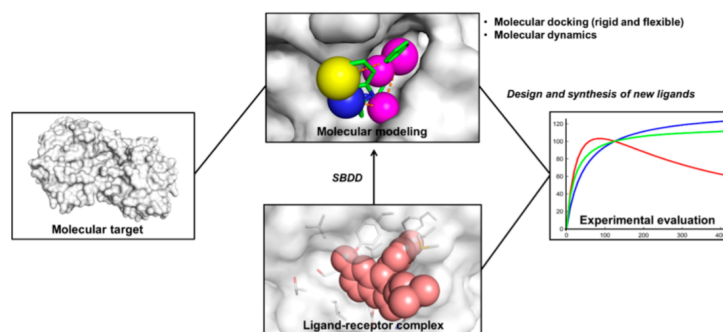


FIGURA 2.3. Esquema del SBDD. La estructura tridimensional del objetivo molecular es empleada en los estudios de modelado molecular. Los compuestos prometedores son sintetizados y posteriormente evaluados. Dado que se descubren moléculas pequeñas bioactivas, se puede obtener la estructura de un complejo ligando-receptor. El complejo de unión se usa en estudios de modelado molecular y se diseñan nuevos compuestos.

ligando-receptor puede ser resuelta, aplicando un proceso de reconocimiento molecular. Las descripciones estructurales del complejo ligando-receptor son útiles para la investigación de sitios de unión, caracterizadas por una key de interacciones moleculares [12].

Una vez ha sido determinado el complejo ligando-receptor, la data recolectada es correlacionada con la información estructural. De esta manera el proceso de SBDD comienza de nuevo con nuevos pasos para incorporar las modificaciones moleculares con el potencial de incrementar la afinidad de nuevos ligandos con el pocket objetivo. La flexibilidad del receptor objetivo es un aspecto crucial que debe ser considerado en la etapa de modelado, ya que puede producirse un cambio sustancial tras la unión del ligando en el pocket. El uso de técnicas como el docking flexible y el MD son útiles para abordar estas incidencias de flexibilidad [13].

2.3.2. Molecular docking. El docking molecular es uno de los métodos de SBDD más usados, por su habilidad para predecir con un alto grado de precisión, la conformación de ligandos para un pocket específico. Seguido al desarrollo de los primeros algoritmos de química computacional en los 1980's, el docking molecular se ha convertido en una herramienta casi mandatoria en el desarrollo e investigación de nuevos fármacos. Por ejemplo, investigaciones en las que se ven involucradas interacciones moleculares importantes, incluidos los modos de unión de ligandos y sus correspondientes interacciones intermoleculares que estabilizan el

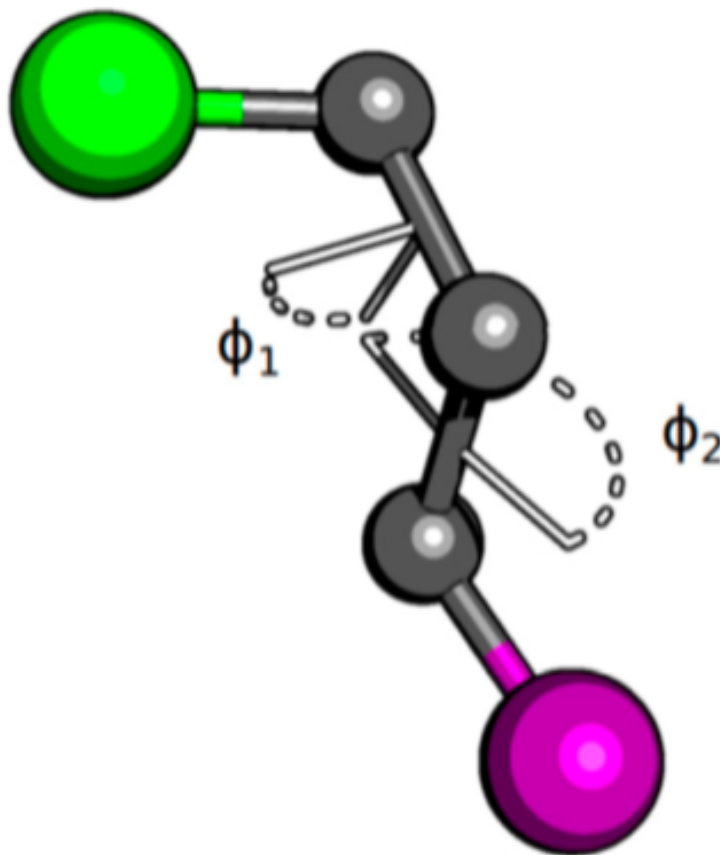


FIGURA 2.4. Búsqueda conformacional. *Una molécula contiene dos grupos voluminosos (morado y verde), tienen su orientación definida por los dos diedros internos 1 y 2*

complejo ligando-receptor, pueden ser realizadas de forma adecuada [14].

En el proceso de docking molecular, existen una serie de etapas que serán descritos a continuación.

2.3.2.1. Búsqueda Conformacional. Durante esta etapa, los parámetros estructurales de los ligandos, como el grado de torsión (diedro), traslacional y rotacional, se modifican incrementalmente [15] (Figura 2.4), para buscar el mejor ángulo que satisfaga las condiciones o restricciones energéticas, ya que se busca la mínima energía en la solución correspondiente al modo de unión más probable. (Figura 2.5). Los algoritmos diseñados para esta búsqueda, realizan las tareas mediante la aplicación de métodos de búsqueda sistemática y estocástica [16] [1].

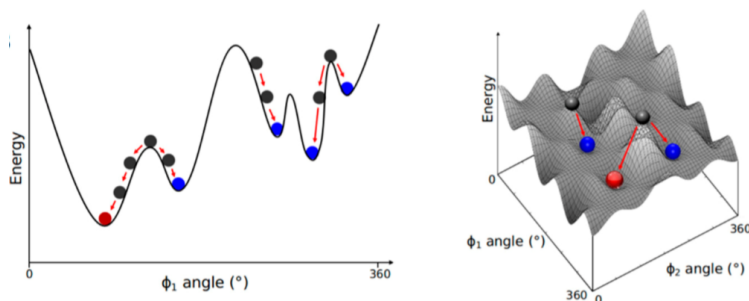


FIGURA 2.5. Búsqueda conformacional. *El algoritmo de búsqueda sistemática cambia todos los parámetros estructurales hasta alcanzar el mínimo de energía local o global*

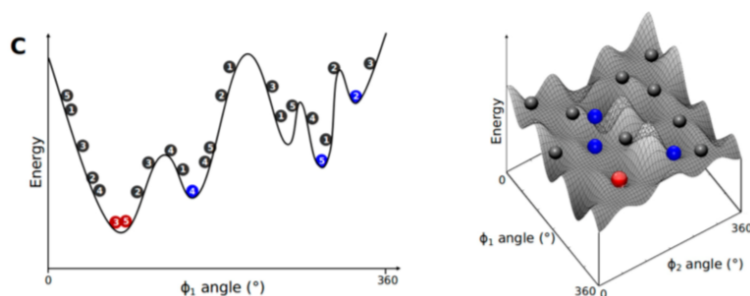


FIGURA 2.6. Búsqueda conformacional. *La búsqueda estocástica explora el espacio y genera al azar distintas conformaciones, poblando el paisaje energético. Este procedimiento aumenta considerablemente la probabilidad de hallar un mínimo de energía global.*

Si bien este método es efectivo cuando se trata de explorar el espacio conformacional, puede converger a un mínimo local en vez de el mínimo global. Esta incidencia puede resolverse implementando búsquedas simultáneas en diferentes conformaciones energéticas[17]. Los métodos estocásticos llevan una búsqueda conformacional modificando aleatoriamente los parámetros estructurales de los ligandos[17]. Para esto, el algoritmo genera varios conjuntos de conformaciones moleculares y pobla un gran rango de las conformaciones energéticas (Figura 2.6). Sin embargo, esta estrategia presenta una barrera que es una limitación muy importante: el costo computacional asociado[17].

Tal como se menciona anteriormente, esta solución posee un gran problema computacional de eficiencia, ya que el método que emplea la búsqueda sistemática, explora todas las posibles combinaciones estructurales. Este número de posibles combinaciones crece exponencialmente

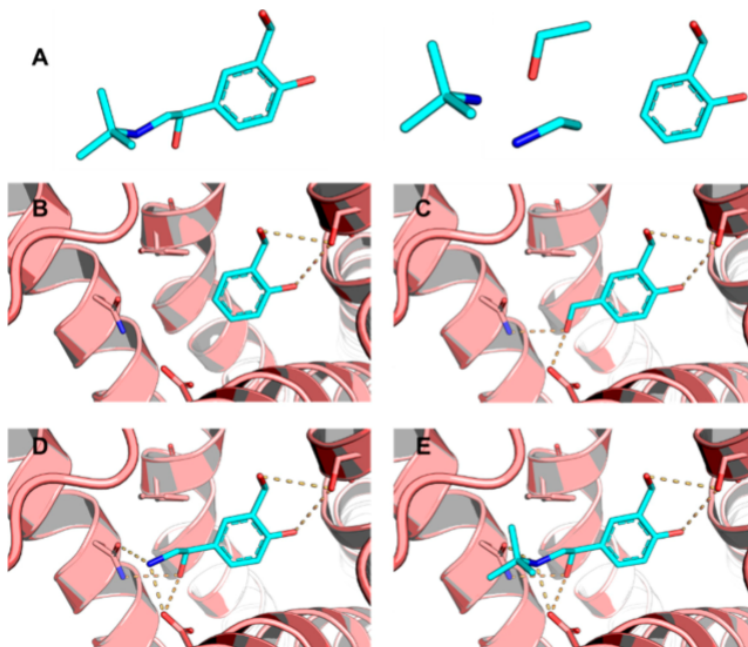


FIGURA 2.7. El método de construcción incremental.. (A) *El ligando es fragmentado*; (B) *Un fragmento es acoplado en el pocket*; (C) *El siguiente fragmento es acoplado al primero*; (D) y (E) *Los demás fragmentos son acoplados secuencialmente para construir el ligando completo en su sitio de unión*.

conforme el ligando se incrementa, resultando en un fenómeno conocido como una “explosión combinatoria”.

Actualmente existen algunos programas de docking, como DOCK, que resuelven este problema aplicando un algoritmo de construcción incremental, en el cual un ligando es gradualmente construido en el pocket (Figura 2.7)[17]. Esta estrategia consiste básicamente en romper la estructura química de un ligando en diversos fragmentos. Luego, una de estas partes es seleccionada y es conectada en una región complementaria del pocket, mientras que los fragmentos restantes son secuencialmente añadidos al fragmento anterior, para formar un ligando completo. Este tipo de algoritmos implementan la búsqueda conformacional solo para los fragmentos que están siendo añadidos a la nueva estructura ligando que está siendo formada, reduciendo considerablemente el problema, evadiendo una explosión combinatoria[18].

2.4. El enfoque de deconstrucción-reconstrucción

La innovación de un enfoque de diseño de fármacos basado en fragmentos (FBDD), ha permitido un progreso rápido y eficiente en el descubrimiento de fármacos. En este punto, se enfocará a informar sobre el método, como se crean las librerías de fragmentos, así como las ventajas y desventajas de filtros basados en fragmentos (FBS), para construir dichas librerías. También se destacará la estrategia de deconstrucción-reconstrucción mediante el uso de fragmentos de ligandos.

2.4.1. El concepto de fragmentos. El uso eficiente de fragmentos con baja potencia para el objetivo como puntos de partida para optimizaciones paso a paso ha atraído la atención recientemente. El concepto de FBDD se remonta a la obra de William Jencks en 1981 [19]. La energía del enlace de la molécula completa con el sitio objetivo puede considerarse como una suma individual de la energía de enlace entre los fragmentos y el pocket. Sin embargo, existen dos obstáculos para su aplicación práctica:

- Cómo identificar los fragmentos adecuados que se unen a los sitios de enlace vecinos.
- Como optimizar estos fragmentos mediante la fusión, vinculación o creciendo para desarrollar moléculas parecidas a las drogas sin distorsiones de sus modos de unión individuales.

El FBDD ha progresado rápidamente y a emergido como una de las tecnologías más importantes para el descubrimiento de drogas. FBDD tiene las ventajas de un cribado integral aleatorio y “un diseño de fármacos basado en la estructura” [20]. Además, FBDD permite una identificación de varios fragmentos activos, que pueden alcanzar los sub-pockets profundos dentro del sitio objetivo. Esta estrategia ofrece varias características bastante atractivas comparada con Virtual screening, incluyendo una mayor tasa de aciertos, mayor eficiencia de enlace y una más efectiva capacidad de optimización.

Desde un punto de vista práctico, mientras más pequeño sea el fragmento, entonces hay más posibilidades de que hayan disponibles modificaciones estructurales adicionales, por lo que es factible buscar más espacios químicos.

2.4.2. Construcción de librería de fragmentos. La construcción de librerías de fragmentos es el primer paso para un FDBB. Para construir una adecuada librería de fragmentos, hay una serie de factores que deben ser considerados, incluyendo:

- Una distinción entre fragmentos y hits y/o leads.
- El tamaño de la librería de fragmentos difiere del de HTS.
- La diversidad estructural de la librería de fragmentos.
- La solubilidad de los fragmentos.
- La semejanza de la droga con los fragmentos[20][21].

De acuerdo a un acumulado de estudios, estos muestran que la mayoría de las drogas pueden ser divididas entre dos o tres fragmentos de acuerdo a sus scaffolds y sus cadenas laterales [7]. Por lo tanto, debe considerarse que la similitud entre fragmentos y fragmentos privilegiados mejora la farmacabilidad de los compuestos cuando se construye la librería de fragmentos [7].

La construcción de la librería de fragmentos comienza con la detección e identificación de las interacciones relativamente débiles entre los fragmentos y una macro molécula objetivo. Actualmente existen pocas técnicas disponibles que son lo suficientemente sensibles para detectar interacciones débiles entre los fragmentos y el sitio objetivo de una macro molécula, y cada una de esas técnicas tiene sus ventajas y desventajas (Tabla 2.1).

2.4.3. Deconstrucción-Reconstrucción. Aunque es diferente del FBS, la deconstrucción de ligandos conocidos puede proveer de una estrategia útil para la construcción de una librería de fragmentos relativamente pequeña. El enfoque de deconstrucción-reconstrucción ha ganado tracción en los últimos años [22]. Tal como se muestra en la (Figura 2.8), el concepto de este enfoque es simple. Como ya se mencionó, el FBDD tradicional combina fragmentos en una molécula final [23]. Por lo tanto, es típicamente posible deconstruir una molécula conocida en varios fragmentos [24][25]. Sin embargo, algunos estudios preliminares sobre ciertas proteínas objetivo, indicaron que los fragmentos resultantes de la deconstrucción de los ligandos conocidos, no recapitularon sus posiciones en un ligando grande.

Recientemente, un grupo de investigadores examinaron fragmentos previamente desarrollados de inhibidores de glycogen phosphorylase por RMN (resonancia magnético nuclear),

Los pros y contras de algunos métodos FBS		
FBS	PROS	CONS
Resonancia Magnética basada en objetivo	Alta sensibilidad Capaz de detectar sitios objetivos	Equipamiento caro Conocimiento profesional Requiere compuestos con peso molecular modesto
TSA	No es caro Aplicable a gran variedad de proteínas	Requiere una gran cantidad de fragmentos Alta tasa de falsos positivos
VS	Rápido y económico	Baja exactitud de predicciones

TABLA 2.1. Pros y contras de varios métodos FBS..*HCS*, *high concentration screening*; *ITC*, *isothermal titration calorimetry*; *MS*, *mass spectrometry*; *SPR*, *surface plasmon resonance*; *TSA*, *thermal shift assay*; *VS*, *virtual screening*; *XRC*, *x-ray crystallography*.

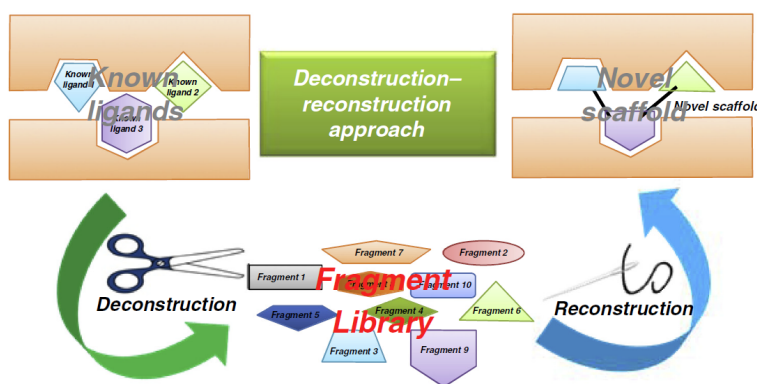


FIGURA 2.8. Enfoque de deconstrucción-reconstrucción. *Representación sistemática del enfoque de deconstrucción-reconstrucción en el diseño de fármacos basado en estructura.*

sugiriendo que la defragmentación no solo proporciona pockets objetivos conservados, si no que también descubre cooperativas entre varios sitios de unión [26].

Los autores concluyen que estos fragmentos derivados naturalmente de argifin, podrían representar puntos de partida atractivos para una mayor optimización basada en la estructura. Generalmente el primer paso de la deconstrucción-reconstrucción, consiste en deconstruir

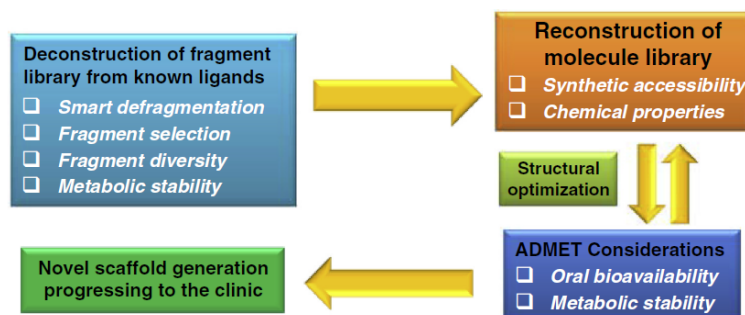


FIGURA 2.9. Enfoque de deconstrucción-reconstrucción. *Diagrama de flujo del enfoque de deconstrucción-reconstrucción en FBDD.*

ligandos conocidos en varios fragmentos que puedan ser más probables que actúan como fármacos clave para FBDD (Figura 2.9).

2.4.4. Moduladores alostéricos positivos al receptor AMPA. En los últimos años, a pesar de los constantes avances en el desarrollo de moduladores alostéricos del receptor AMPA, ningún fármaco ha podido llegar al mercado. No obstante, numerosas estructuras co-cristalinas ligando proteína con diversos ligandos de la isoforma GluA2 de los receptores AMPA están disponibles actualmente, siguiendo a 2 décadas de investigación.

Esto fue gracias a que después de un análisis detallado de superposición de estas estructuras cristalizadas, se aplicó un enfoque de deconstrucción-reconstrucción para diseñar y sintetizar dos PAM receptores de AMPA con potencia in vitro y una notable eficacia in vivo para prevenir neuroapoptosis[27] (Figura 2.11)[7].

El primer paso de este proceso fue deconstruir estos ligandos conocidos para construir una pequeña librería de fragmentos. El análisis estructural de estos, condujo a un panorama general de sitios de unión de estos fragmentos (Figura 2.10 a). Se encontró que el fragmento 3, acomodaba en la cavidad profunda y cubría un mayor espacio de interacción en el pocket S3.

Se realizó una reconstrucción y diseño de una serie de ligandos bivalentes asimétricos fusionando el fragmento 3 con varios fragmentos privilegiados seleccionados de la biblioteca de fragmentos (Figura 2.10 b). Después de un cálculo de interacciones electroquímicas y estudios de docking molecular (Figura 2.10 c), de esta nueva biblioteca de compuestos, se sintetizaron dos compuestos prometedores que fueron evaluados farmacológicamente. Estos

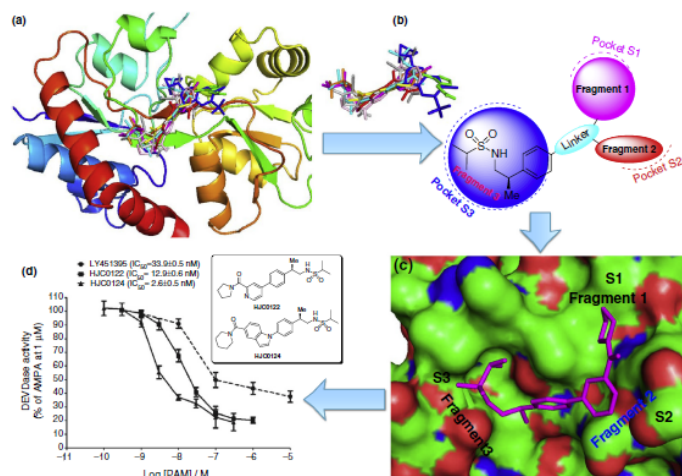


FIGURA 2.10. Descubrimiento de HJC0122 y HJC0124. (a) *Análisis de superposición de las nueve PAM conocidas con PDB disponibles.* (b) *Enfoque general de deconstrucción-reconstrucción.* (c) *Modo de unión predicho de HJC0122 (rosa).* (d) *Modulación del efecto de AMPA sobre la actividad inducida. Recuadro de estructuras químicas de los agentes sintetizados [27].*

dos compuestos, HJC0122 y HJC0124, mostraron una alta potencia y eficacia para prevenir la neuroapoptosis (Figura 2.10 d).

Capítulo 3

Metodología

3.1. Definición del Método y Enfoque.

Con lo definido en la introducción, se busca encontrar ligandos candidatos a inhibidores de la proteína HSP90, estructura ampliamente conocida y con estructura cristalizada disponible, características imprescindibles para una estrategia en particular, por lo cual se decide en optar el utilizar una estrategia de diseño de drogas basada en estructura.

Como se señala en el marco teórico, existen una gran cantidad de métodos y enfoques útiles para el diseño de drogas basado en estrategias computacionales, sin embargo, debido a los crecientes descubrimientos de un método en particular, se ha optado por este por sobre el resto, el método FBDD, que corresponde a un diseño de drogas basado en fragmentos.

Se decidió por utilizar una metodología de FBDD, la cual consiste en un diseño de drogas basado en fragmentos. Para hacer uso de esta metodología, se ha determinado el hacer uso del enfoque de deconstrucción-reconstrucción descrito en el marco teórico, al ser un enfoque que ha demostrado y conseguido resultados prometedores en otras investigaciones, y además, por ser este un campo que actualmente está siendo reforzado y dando buenos resultados en el descubrimiento de ligandos potenciales a convertirse en drogas para ser sintetizadas [7].

3.2. Reglas y Restricciones

Al decidir utilizar una metodología de FBDD y un enfoque de deconstrucción-reconstrucción, es necesario establecer las respectivas reglas y restricciones esenciales de este enfoque, para poder obtener fragmentos que sean viables de evaluar en reacciones electroquímicas y que sean posibles de sintetizar, así como que sean candidatos adecuados en una futura reconstrucción para dar paso a nuevo ligando. Para esto, existen tres reglas principales ya definidas, denominadas RO3 (Rule of Three) [7].

Las RO3 consisten en tres reglas, que están dadas por un derivado de las Reglas de 5 de Lipinsky:

- Peso molecular del fragmento debe ser MENOR a 300.
- El número de donadores y receptores de hidrógeno debe ser MENOR O IGUAL a tres.
- El cLogP, o coeficiente de reparto, debe ser MENOR O IGUAL a 3.

Además, es destacado por los autores [7], que también es necesario tener en cuenta algunas restricciones, que son avaladas por la comunidad científica. Estas restricciones han sido definidas gracias a numerosos estudios y corresponden a los siguientes puntos:

- División de ligando: Un ligando puede ser dividido en 2 o máximo 3 fragmentos, respetando su scaffolding y cadenas laterales [28].
- Se debe tomar en cuenta la solubilidad de los fragmentos

3.3. Construcción de librería de fragmentos

Para finalizar la construcción de la librería de fragmentos, se debe realizar una interacción entre fragmentos y el pocket principal de la proteína objetivo. El motivo de esta interacción, es desarrollar una especie de “docking”, pero en vez de utilizar un ligando, se hace docking con los fragmentos, de forma de detectar los fragmentos que produzcan interacciones energéticas viables para que se vea implementada una futura reconstrucción [7].

3.4. Técnicas Utilizadas

En esta etapa, se da por una iteración de codificaciones, para implementar en cada una de estas, una de las RO3, hasta completar un algoritmo que posea la totalidad de las RO3 implementadas, garantizando así una fiabilidad en los fragmentos, haciendo que estos sean válidos para una evaluación energética para la construcción de la librería de fragmentos.

Posterior a la mitigación, se planea realizar al menos 3 grandes etapas o iteraciones de codificación para implementar incrementalmente cada una de las RO3, hasta completar un algoritmo que posea la totalidad de las RO3 implementadas, garantizando así con el cumplimiento de estas, una fiabilidad en los fragmentos, haciendo que estos sean válidos para una evaluación energética para la construcción de la librería de fragmentos.

El proceso correspondiente al desarrollo del algoritmo está representado en un modelo de procesos bpmn, descrito en la Figura 3.1.

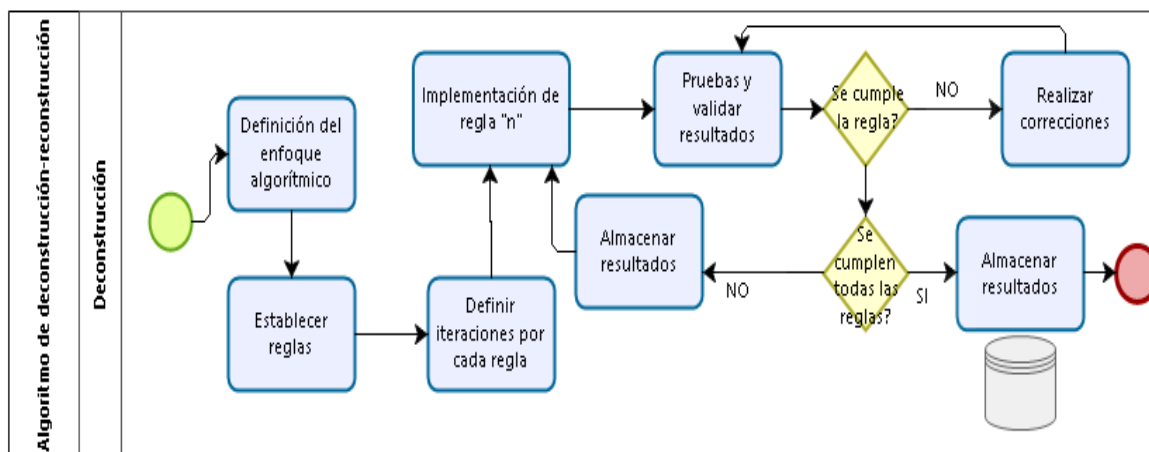


FIGURA 3.1. Diagrama de procesos construcción de algoritmo.

3.4.1. Extracción de Datos Desde pdb. Para comenzar, se debe entender que un fichero de extensión .pdb corresponde a una representación un determinado compuesto químico, en forma de datos que pueden ser interpretados. Los archivos .pdb se utilizan en la química computacional para visualizar los compuestos en herramientas de modelado 3d, tales como Pymol.

La entrada del algoritmo a desarrollar, deberá ser este archivo de extensión .pdb, que contiene toda la información necesaria de los ligandos. Así mismo, las salidas del algoritmo deben ser también ficheros .pdb con su correcta estructura, para que la visualización de las moléculas sea correcta en la herramienta Pymol. La estructura del fichero pdb, se da en las siguientes tablas (Tabla 3.1 y Tabla 3.2).

Record	Número de Átomo	Tipo de Átomo	Tipo de Amino	Cadena	Residuo
HETATM	1	C	UNK	0	0

TABLA 3.1. Primera parte estructura .pdb

Coordenada X	Coordenada Y	Coordenada Z	Ocupancia	Beta-Factor	Elemento
12.003	-10.132	0.00	1.00	0.00	C+0

TABLA 3.2. Segunda parte estructura .pdb

En el algoritmo, la extracción de datos del .pdb se divide en dos partes, una función que se encarga de obtener la sección que se compone por átomos, y la función que obtiene el tramo que se compone por las conexiones que representan los enlaces químicos que unen los átomos de forma lógica. Las funciones encargadas son las siguientes:

```
1 def cargarElementos(nombreArch, listaElementos):
2     archivo = open(nombreArch)
3     for line in archivo:
4         if ('HETATM' in line):
5             listaElementos.append(line)
6     archivo.close
7     return listaElementos
```

En la función `cargarElementos`, se tiene que se recibe el archivo .pdb, y una lista vacía. Para indexar únicamente las líneas correspondientes a elementos químicos, se aprovecha una de las propiedades del .pdb, discriminando por 'HETATM', que corresponde a una palabra clave que representa a los elementos químicos. Al encontrar dicha palabra clave, se indexa la línea en la lista de los elementos.

Así mismo, existe la función `cargarConecciones`, que funciona de similar modo, solo que a diferencia de la palabra clave 'HETATM', utiliza la palabra clave 'CONNECT', ya que en las líneas con dicha palabra, almacenan el orden de las conexiones de los elementos del ligando. A continuación, la función:

```
1 def cargarConecciones(nombreArch, listaConecciones):
2     archivo = open(nombreArch)
3     for linea in archivo:
4         if ('CONNECT' in linea):
5             listaConecciones.append(linea)
6     archivo.close
7     return listaConecciones
```

Una vez obtenidos independientemente las listas de elementos y conexiones, se procede a definir constantes que almacenan los valores de los pesos moleculares de todos los elementos químicos de la tabla periódica. Así mismo, también se crean constantes que representan las restricciones, las cuales son:

```

1 DADORES = 3
2 RECIBIDORES = 3
3 MAXIMOPM = 300

```

También, se definen las tuplas que corresponden a la regla de aceptadores y dadores de hidrogeno, utilizando un subtipo de los campos de fuerza más utilizados en la química computacional: CHARM27 y GLYCAM06.

```

1 TUPLAACEPTORES = {
2     'CHARM27': tuple(set(['O', 'OC1', 'OC2', 'OH2',
3     'OW', 'OD1', 'OD2', 'SG', 'OE1', 'OE1', 'OE2',
4     'ND1', 'NE2', 'SD', 'OG', 'OG1', 'OH'])),
5     'GLYCAM06': tuple(set(['N', 'NT', 'O', 'O2',
6     'OH', 'OS', 'OW', 'OY', 'SM'])))
7 }

```

```

1 TUPLADADORES = {
2     'CHARM27': tuple(set(['N', 'OH2', 'OW', 'NE',
3     'NH1', 'NH2', 'ND2', 'SG', 'NE2', 'ND1', 'NZ',
4     'OG', 'OG1', 'NE1', 'OH'])),
5     'GLYCAM06': tuple(set(['N', 'NT', 'N3', 'OH',
6     'OW'])))
7 }

```

Las tuplas anteriores, corresponden a los elementos y compuestos definidos como dadores y recibidores cuando las condiciones físico-químicas son las adecuadas, en el contexto de campo de fuerza, por lo cual se utilizan los ya definidos en estas tuplas para validar en el algoritmo a los dadores y recibidores de hidrógeno.

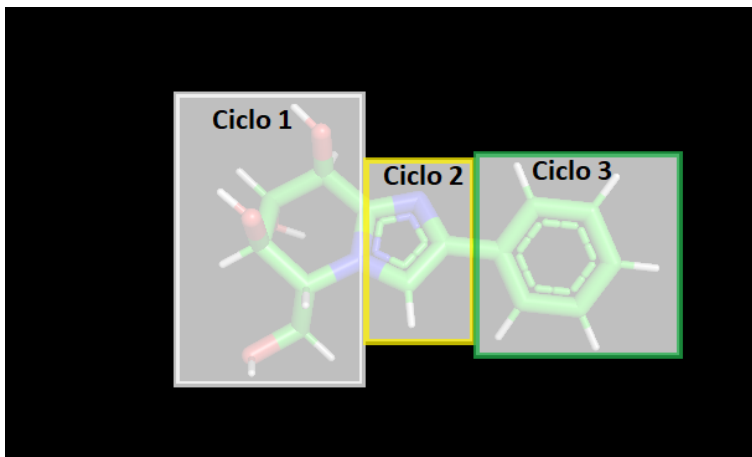


FIGURA 3.2. Ciclos de un ligando. *Ligando que posee tres Ciclos: Ciclo1, Ciclo2 y Ciclo3*

3.4.2. Transformación de PDB a SDF. Una vez obtenidos los datos relevantes, es necesario transformar el archivo a una extensión SDF, puesto que hay una librería llamada OpenBabel [30], que hace validaciones químicas. Esta librería, está ampliamente validada y documentada

Con el archivo sdf, se utilizan algunas funcionalidades de la librería OpenBabel para validar reglas definidas anteriormente.

3.4.3. Ciclos de una molécula. Tras reuniones con el núcleo, se ha llegado a detectar un problema, el cual no es mencionado en el paper principal en el que se basa esta investigación [7]. Este problema consiste en que los ligandos, no pueden ser divididos o fragmentados dentro de un ciclo”. Un ciclo consiste en una unión de átomos que forma una figura geométrica cerrada, como se puede observar en la figura 3.2. A simple vista, en la figura existe solo una posible ubicación de fragmentación, esta es en el átomo que divide el ciclo 2 y el ciclo 3.

3.5. Iteraciones de codificación

Basado en el modelo de procesos de la sección 3.4 y además teniendo en cuenta ya las constantes y tuplas que representan las principales reglas de fragmentación (RO3), se procede a definir tres grandes iteraciones:

- Implementación de regla del peso molecular
- Implementación de la regla correspondiente a los dadores y recibidores de hidrógeno
- Implementación de la regla correspondiente a la representación del cLogP

3.6. Casos de prueba

Existen tres casos de prueba principales a realizar en este proyecto, los cuales son:

- **Caso 1. Implementación de RO3:** implementar incrementalmente cada una de las 3 reglas RO3, para llegar a evaluar en la fragmentación la totalidad de estas.
- **Caso 2. Validación salida .sdf:** validar por cada iteración de implementación de reglas RO3, que la salida .sdf respete el orden lógico estructural del archivo, para que este tenga sentido y sea posible su visualización en Pymol.
- **Caso 3. Ligando HSP-90:** una vez implementadas las reglas y validadas las salidas sdf, se deben utilizar los dos ligandos definidos para pruebas que se conoce interactúan con la proteína HSP-90.

3.7. Resultados esperados

En primera instancia, se espera que para el caso 1, se puedan implementar la totalidad de las reglas RO3, para que efectivamente se tengan en las salidas, fragmentos que sean válidos según los estándares definidos por la comunidad científica [7].

Así mismo, se espera que las salidas .sdf respeten el orden y estructura de este tipo de extensión, para que sean entradas válidas para un algoritmo de reconstrucción y también para visualización en herramientas como Pymol.

Otro resultado esperable, es el poder detectar los casos en que los fragmentos no cumplan reglas, es decir, fragmentos no válidos, para así poder construir una data histórica de los fragmentos que no se pueden utilizar, ya que es un material valioso para estudios posteriores, con motivo de evadir fragmentaciones defectuosas.

3.8. Trazabilidad

Para determinar si se cumplen los objetivos específicos ya definidos, es necesario definir las tareas que los componen, y hacer una respectiva matriz de trazabilidad para determinar qué tarea corresponde a los determinados objetivos. Se tienen los siguientes **objetivos específicos**:

- Objetivo 1: Diseñar un algoritmo para la fragmentación de ligandos, centrándose únicamente en la evaluación de las reglas RO3.
- Objetivo 2: Construcción de una librería de fragmentos a partir de un enfoque de deconstrucción-reconstrucción [7], para obtener un 20 % más de fragmentos viables que las soluciones actuales.
- Objetivo 3: Disminuir el costo computacional de la construcción de la librería de fragmentos en un 20 %.

Así mismo se definen las siguientes **tareas**:

- Tarea 1: Implementación secuencial de las reglas RO3 en el algoritmo.
- Tarea 2: Análisis del algoritmo para implementación de optimización en su orden de algorítmico.
- Tarea 3: Análisis de resultados obtenidos y comparativas con otros estudios
- Tarea 4: Comparativa entre método utilizado actualmente por el equipo de la facultad de química del Núcleo de investigación y el método del algoritmo propuesto.

Teniendo ya definidos los objetivos específicos y las tareas, es el momento de dar paso a la matriz de trazabilidad Objetivos vs Tareas, de la tabla (Tabla 3.3).

	Tarea 1	Tarea 2	Tarea 3	Tarea 4
Objetivo 1	X			
Objetivo 2			X	X
Objetivo 3		X		

TABLA 3.3. Matriz de trazabilidad Objetivos vs Tareas

Capítulo 4

Resultados

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos por la ejecución algoritmo, analizando estos resultados por cada uno de los casos de prueba propuestos en el capítulo 3, sección 6. Estos resultados son verificados también en la herramienta de visualización Pymol, para ver que los fragmentos obtenidos del algoritmo de deconstrucción sean coherentes. Así mismo, se utilizarán en primera instancia 2 archivos .pdb, los cuales son los siguientes:

- amiloxate.pdb: es un compuesto químico activo, agente de la protección solar.
- gluco.pdb: pdb correspondiente a la configuración química de una glucosa.

Ya obteniendo resultados teniendo implementadas la totalidad de R03, se procederá a probar el algoritmo con dos ligandos conocidos que interactúan con la proteína objetivo HSP-90, ambas entradas son archivos pdb, los cuales corresponden a:

- obj0.pdb: corresponde a un ligando que tiene afinidad con la proteína objetivo HSP-90.
- frag-3k99.pdb: ligando que, según estudios, posee leves actividades inhibitorias de la HSP-90.

4.1. El algoritmo

El algoritmo de esta primera instancia, fue desarrollado en Python versión 2.7, posee de entrada un archivo en extensión .pdb que contiene la información sobre la conformación de un ligando, la salida es una fragmentación del ligando en “n” archivos de extensión .sdf, que sirven de entrada a una herramienta de modelado 3d de elementos químicos como lo es PyMol, y además, como entrada a un segundo algoritmo de reconstrucción.

A grandes rasgos el algoritmo consiste básicamente en una representación de la entrada en una lista, esta lista luego es fragmentada en “n” elementos; cada uno de estos elementos, representa un fragmento del ligando de entrada. El algoritmo toma estos “n” fragmentos y luego los envía a una función, que, de uno en uno verifica las reglas RO3, calculando el peso molecular de cada una de estas para respetar la primera regla del peso molecular. Posteriormente, se continúan verificando cada una de las reglas RO3, hasta validar la totalidad de estas. Si los fragmentos cumplen con las reglas, se crean los ficheros .sdf correspondientes a fragmentos, si no cumplen con la regla, los fragmentos defectuosos son creados, pero se destaca que son no válidos por reglas, destacando cuál o cuáles de estas no cumplen. Por

ende, se tiene de salida “n” archivos con extensión .sdf para visualización en la herramienta PyMol y entrada a un futuro algoritmo de reconstrucción.

4.1.1. Librerías externas. Para hacer validaciones definitivas de los fragmentos, se utiliza una librería llamada OpenBabel. Open Babel es una herramienta computacional de código abierto, con funciones para analizar estructuras químicas descritas en un modelado molecular como lo puede ser un .pbd o un .sdf La librería está codificada en C++, pero está pensada para ser utilizada en ambientes python, pero puede ser utilizada en lenguajes C++ y Python. Open babel ofrece además la librería Pybel, la cual trabaja exclusivamente con ambientes de Python. Pybel [29] ofrece dunciones y clases prácticas que simplifican el uso de las librerías de Open Babel, especialmente en cuanto a las entradas y salidas de archivos (pdb, sdf), para acceder a los atributos de los átomos que componen las entradas.

El algoritmo está disponible en un repositorio privado de Gitlab, al cuál se debe solicitar acceso al mail: danielandr.diaz@gmail.com .

4.2. Caso de prueba 1

Este caso de prueba corresponde a la implementación de las reglas RO3 incrementalmente, por lo cual se tienen 3 implementaciones en el siguiente orden:

- Regla 1: Regla de peso molecular menor a 300
- Regla 2: Regla de dadores menores 3 y recibidores menores a 3
- Regla 3: Regla de cLogP menor 3

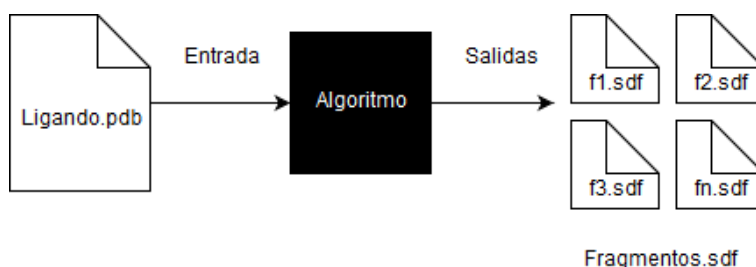


FIGURA 4.1. Modelo de caja negra. *Entra un fichero .pdb y se fragmenta en "n" nuevos fragmentos en formato .sdf, validos para visualización en pymol y de entrada para una reconstrucción.*

```
Fragmento valido, PM: 28.05316
Fragmento valido: salidaSdf1.sdf
Fragmento valido: salidaSdf2.sdf
```

La imagen muestra una interfaz de línea de comandos con un fondo oscuro. El texto está en color verde y blanco. Se ven tres líneas de salida: la primera indica un fragmento válido con un peso molecular (PM) de 28.05316; las siguientes dos indican los archivos de salida para los fragmentos: 'salidaSdf1.sdf' y 'salidaSdf2.sdf'.

FIGURA 4.2. Salida por consola. *La salida por consola de la ejecución del algoritmo, se recalca el peso molecular de fragmento*

4.2.1. Regla 1: En esta regla, se implementa el que el peso molecular de cada fragmento debe ser menor estricto que 300 unidades. A continuación se presentan los resultados obtenidos en las Figuras (4.2, 4.3 y 4.4)

En primera instancia se ha codificado un algoritmo para mitigación del riesgo antes de el desarrollo de la primera iteración del algoritmo. Esta mitigación del riesgo considera la primera de las reglas, que consiste en que cada fragmento debe poseer un peso molecular total menor a 300. Además, como es una primera etapa para mitigación, se fragmenta un único ligando en "n" fragmentos.

El número de fragmentos resultantes, es indeterminado, puesto que depende de factores físico-químicos, sin embargo en el mejor de los casos, si se cumple la regla del peso molecular menor a 300, se obtendrá al menos un fragmento. El algoritmo funciona bajo el esquema de caja negra de la figura (Figura 4.1)

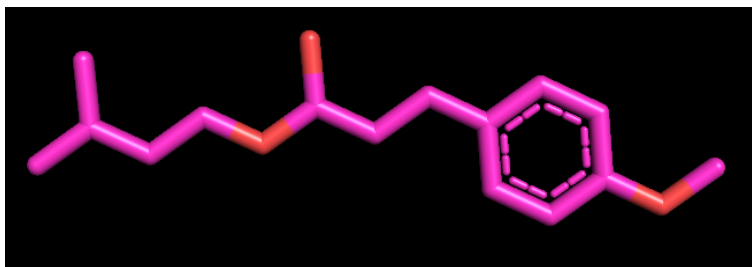


FIGURA 4.3. Amiloxate. *Compuesto químico de entrada al algoritmo*

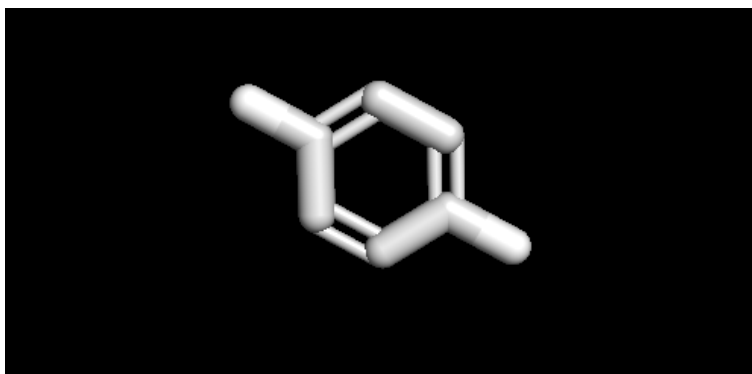


FIGURA 4.4. Fragmentos en Pymol *Visualización en Pymol uno de los fragmentos de salida del algoritmo*

4.2.2. Regla 2: La segunda regla implementada corresponde a los dadores y recibidores de hidrógeno, de estos se sabe según los estudios [7], que deben ser menores o iguales a 3 cada uno.

En esta segunda instancia se ha realizado la programación correspondiente a los dadores y recibidores de hidrógeno. Para esto, se tienen dos contadores parciales que se dedican a llamar a una función que verifica la cantidad de dadores y aceptores en cada fragmento, a medida que se van recorriendo los elementos químicos del fragmento.

La entrada del algoritmo para este caso, en la implementación de la segunda regla corresponde a la glucosa, en `gluco.pdb`, visualizada en Pymol como la molécula de la Figura 4.7

Se tienen tres resultados, estos corresponden a la salida por consola del algoritmo (Figura 4.5), que corresponden a mensajes informativos de la fragmentación, con los pesos moleculares, cantidad de dadores y aceptores de cada fragmento.

También otra de las salidas corresponde a los `.pdb` generados (Figura 4.6) respectivos de cada fragmento, los cuales respetan la estructura propia que este tipo de ficheros debe poseer.


```

Fragmento no valido, Aceptores de H:  5

Fragmento valido:  salidaSdf1.sdf

Ligando fragmentado en: 0.137918949127 segundos  ---

```

FIGURA 4.5. Salida por consola. *Salida por consola de las dos reglas ya implementadas.*

```

3  2  0  0  0  0  0  0  0  0  0999 V2000
    1.7321 -0.0000  0.0000 *  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
    0.8660  0.5000  0.0000 C  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
   -0.0000 -0.0000  0.0000 O  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
1  2  1  0  0  0  0
2  3  1  0  0  0  0
M  ISO  1  1  8
M  END
$$$$

```

FIGURA 4.6. .pdb de uno de los fragmentos. *Resultado correspondiente a la salida del algoritmo en .sdf de uno de los fragmentos que respeta dos reglas de fragmentación.*

Teniendo ya los .sdf correspondientes a cada uno de los fragmentos de salida del algoritmo, es necesario el visualizarlos en la herramienta de visualización Pymol, y se muestran en la Figura 4.8

Sin embargo, gracias a esta visualización se puede observar que hay un error en la fragmentación, puesto que la molécula fue rota en un ciclo. Un ciclo corresponde a una estructura cerrada.

```

1 contadorparcialFragmento1 = contadorparcialFragmento1 +
    cantidadAceptoresLinea(ACEPTORES_CHARM27, elements)
2 dadoresPF = dadoresPF + cantidadDadoresLinea(DADORES_CHARM27, elements)

```

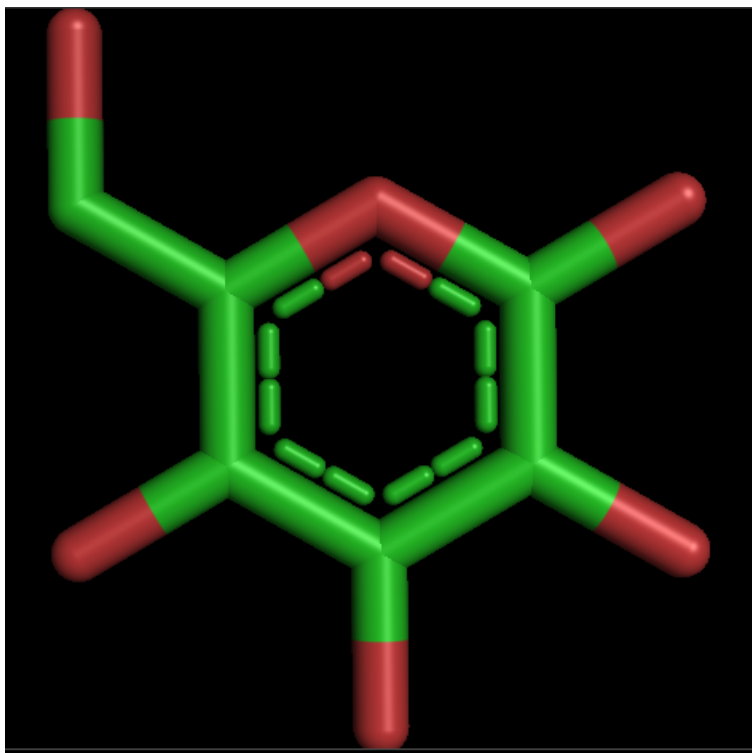


FIGURA 4.7. Entrada del algoritmo *Visualización del compuesto de entrada para la fragmentación*

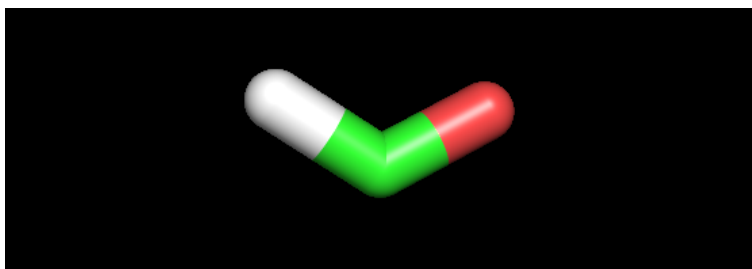


FIGURA 4.8. Salida de la fragmentación *Resultado de la fragmentación producto de dos reglas ya implementadas, cuenta con 1 fragmento válido(según reglas), visualizados en Pymol*

4.2.3. Regla 3: En lo correspondiente a la tercera regla, a implementar, se tiene que se debe calcular el ClogP, el cuál es una constante de permeabilidad de un compuesto químico con respecto de la membrana celular. Esta constante representa la capacidad que tiene un determinado fármaco, de atravesar la membrana celular, para interactuar con una proteína y proveer una actividad inhibidora en la proteína objetivo.

Para la implementación de esta tercera instancia, se utiliza la librería Open Babel, y Pybel, para obtener el cálculo del ClogP. Para esto, se toman los fragmentos en formato .pdb y se utiliza un comando para transformar el fragmento.pdb a un formato amigable con Pybel, el cual corresponde a .sdf

```
1 subprocess.check_call(['babel', 'fragmento.pdb', 'fragmento.sdf', '-m'])
```

Posteriormente, se hace la respectiva validación de la constante logP utilizando Pybel, en la siguiente codificación.

```
1 def validarFragmento(nombre_archivo):
2     logP = 0.0
3     for molecula in readfile('sdf', nombre_archivo):
4         descvalues = molecula.calcdesc()
5         logP = float(descvalues['logP'])
6         if(logP < reglaClogP):
7             print 'fragmento valido'
8         else:
9             os.remove(nombre_archivo)
```

4.3. Caso de prueba 2

Este caso de prueba corresponde a la validación de las salidas del algoritmo en su formato .sdf en cada iteración de implementación de reglas RO3. Se debe cumplir que la salida .sdf respete el orden lógico estructural del archivo, para que este tenga sentido y sea posible su visualización en Pymol.

En primera instancia, se tiene la entrada en formato .pdb del caso de prueba implementado con dos reglas (peso molecular y dadores/recibidores de hidrógeno), en el cual se pueden observar los elementos y conexiones 4.9

Luego de entrar al algoritmo y ejecutada la fragmentación, el algoritmo arroja "n" fragmentos en el respectivo formato .sdf, cuyo formato se mantiene coherente respecto a la estructura original del .sdf de la entrada (Figura 4.10, 4.11).

```

9  HETATM  1  O  UNK  0      2.667  1.540  0.000  0.00  0.00      O+0
10 HETATM  2  C  UNK  0      1.334  0.770  0.000  0.00  0.00      C+0
11 HETATM  3  C  UNK  0      1.334 -0.770  0.000  0.00  0.00      C+0
12 HETATM  4  O  UNK  0      2.667 -1.540  0.000  0.00  0.00      O+0
13 HETATM  5  C  UNK  0      0.000 -1.540  0.000  0.00  0.00      C+0
14 HETATM  6  O  UNK  0      0.000 -3.080  0.000  0.00  0.00      O+0
15 HETATM  7  C  UNK  0     -1.334 -0.770  0.000  0.00  0.00      C+0
16 HETATM  8  O  UNK  0     -2.667 -1.540  0.000  0.00  0.00      O+0
17 HETATM  9  C  UNK  0     -1.334  0.770  0.000  0.00  0.00      C+0
18 HETATM 10  O  UNK  0      0.000  1.540  0.000  0.00  0.00      O+0
19 HETATM 11  C  UNK  0     -2.667  1.540  0.000  0.00  0.00      C+0
20 HETATM 12  O  UNK  0     -2.667  3.080  0.000  0.00  0.00      O+0
21 CONECT   1  2
22 CONECT   2  1  3 10
23 CONECT   3  2  4  5
24 CONECT   4  3
25 CONECT   5  3  6  7
26 CONECT   6  5
27 CONECT   7  5  8  9
28 CONECT   8  7
29 CONECT   9  7 10 11
30 CONECT  10  9  2
31 CONECT  11  9 12
32 CONECT  12 11

```

FIGURA 4.9. Estructura de entrada *Estructura del .pdb de la entrada del algoritmo.*

```

3  2  0  0  0  0  0  0  0  0  0999 V2000
   1.7321 -0.0000  0.0000 *  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
   0.8660  0.5000  0.0000 C  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -0.0000 -0.0000  0.0000 O  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
1  2  1  0  0  0  0
2  3  1  0  0  0  0
M ISO  1  1  8
M END
$$$$

```

FIGURA 4.10. Salida primer fragmento *Estructura del .sdf de la salida del primer fragmento.*

```

11 11  0  0  0  0  0  0  0  0  0999 V2000
  -0.8660 -1.5000  0.0000 *  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -0.8660 -0.5000  0.0000 C  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -1.7321 -0.0000  0.0000 O  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -1.7321  1.0000  0.0000 C  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -2.5981  1.5000  0.0000 O  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -0.8660  1.5000  0.0000 C  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -0.8660  2.5000  0.0000 O  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -0.0000  1.0000  0.0000 C  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
   0.8660  1.5000  0.0000 O  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
  -0.0000 -0.0000  0.0000 C  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
   0.8660 -0.5000  0.0000 O  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
1  2  1  0  0  0  0
2 10  2  0  0  0  0
2  3  1  0  0  0  0
3  4  1  0  0  0  0
4  5  2  0  0  0  0
4  6  1  0  0  0  0
6  7  1  0  0  0  0
6  8  2  0  0  0  0
8  9  1  0  0  0  0
8 10  1  0  0  0  0

```

FIGURA 4.11. Salida segundo fragmento *Estructura del .sdf de la salida del segundo fragmento (Fragmento no válido por reglas).*

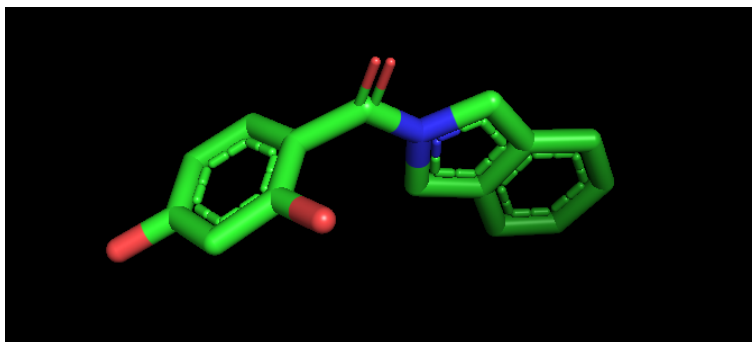


FIGURA 4.13. Ligando frag-3k99 *Visualización en pymol del ligando*

```
=====
salidaSdf1.sdf
=====
*** Open Babel Error in ParseFile
    Could not find contribution data file.
Fragmento valido, PM: 109.1027 logP: 0.898 Donantes de H: 2 Aceptores de H: 3
=====
salidaSdf2.sdf
=====
*** Open Babel Error in ParseFile
    Could not find contribution data file.
Fragmento valido, PM: 144.15004 logP: 2.1587 Donantes de H: 0 Aceptores de H: 2

Fragmento valido: salidaSdf1.sdf
Fragmento valido: salidaSdf2.sdf

Ligando fragmentado en: 0.202157020569 segundos ---
```

FIGURA 4.14. Salida por consola *Salida por consola una vez ejecutado el algoritmo de fragmentación*

que el ligando de entrada, fue fragmentado en 2 fragmentos, los cuales además, cumplen con las reglas RO3, por ende, se consideran ambos como fragmentos válidos, siendo además desplegada la información de los resultados de las reglas.

Luego, ya que se tienen dos fragmentos válidos, es necesario ahora validar si los fragmentos son también visualizables con la herramienta Pymol. Esta validación se puede observar en las Figuras 4.15 y 4.16.

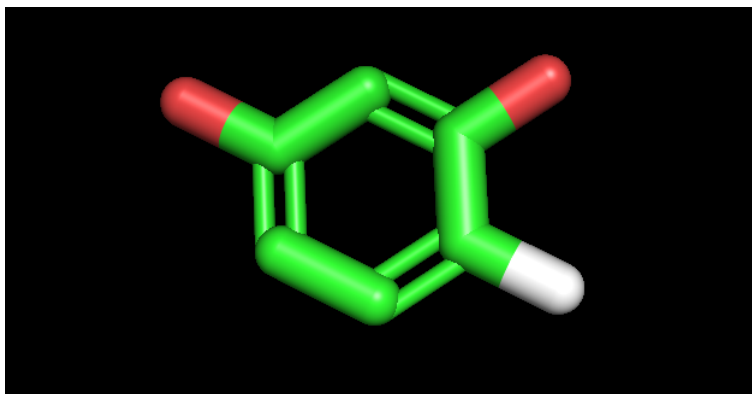


FIGURA 4.15. Salida por consola *Salida por consola una vez ejecutado el algoritmo de fragmentación*

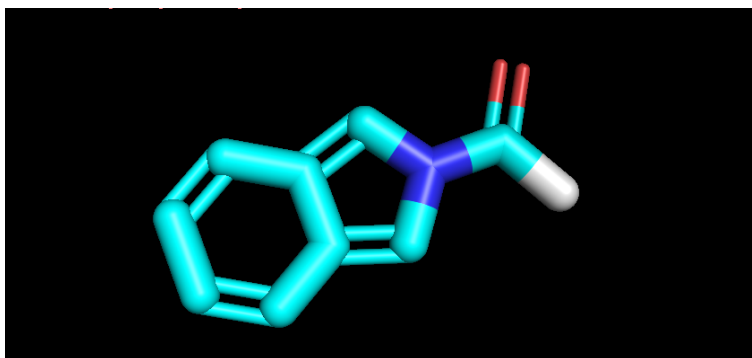


FIGURA 4.16. Salida por consola *Salida por consola una vez ejecutado el algoritmo de fragmentación*

4.4.2. obj02. Se toma el ligando obj02.pdb como entrada inicial del algoritmo. Esta entrada, se visualiza en Pymol para observar la estructura del mismo, la cual puede ser visualizada en la Figura 4.17. Ya teniendo la entrada, se toma esta misma para ejecutar el algoritmo, el cual presenta una salida por consola, esta salida está disponible en la Figura 4.18.

En la salida por consola, se puede observar que el ligando de entrada fue fragmentado en 3 fragmentos, de los cuales además 2 de ellos no cumplen con las reglas RO3, por ende, se considera solo un único fragmento como válido: salidaSdf2.sdf, que al ser visualizada en Pymol, corresponde al fragmento apreciado en la Figura 4.19.

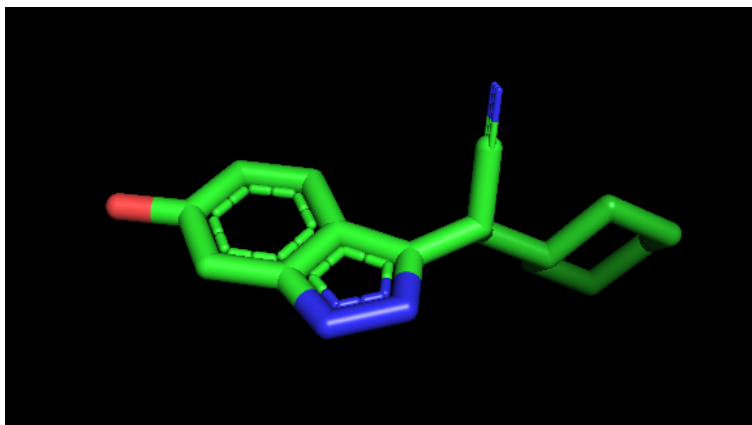


FIGURA 4.17. Obj02.pdb *Visualización en Pymol del ligando afín a la HSP-90.*

```

=====
salidaSdf1.sdf
=====
*** Open Babel Error in ParseFile
    Could not find contribution data file.
Fragmento no valido, Aceptores de H:  4
=====
salidaSdf2.sdf
=====
*** Open Babel Error in ParseFile
    Could not find contribution data file.
Fragmento valido, PM:  83.15154  logP:  2.2883 Donantes de H:  0 Aceptores de H:  1
=====
salidaSdf3.sdf
=====
*** Open Babel Error in ParseFile
    Could not find contribution data file.
Fragmento no valido, Aceptores de H:  4

Fragmento valido:  salidaSdf2.sdf

Ligando fragmentado en: 0.183218955994 segundos  ---

```

FIGURA 4.18. Salida por consola de ejecución del algoritmo *Salida por consola del algoritmo, con la entrada del ligando obj02*

4.5. Trazabilidad de los casos de prueba

Se tiene que ya se han implementado la totalidad de las reglas RO3 [7], definidos anteriormente y además se han completado los casos de prueba 1 y 2 definidos en la metodología. A continuación, se presenta la matriz de trazabilidad asociada a los casos de prueba y cada una de las iteraciones de codificación de las reglas en la Tabla 4.1

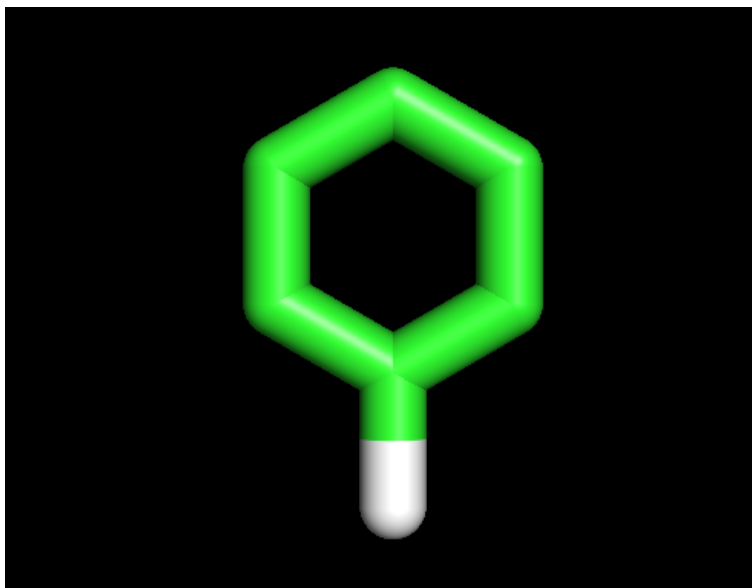


FIGURA 4.19. salida2Sdf.sdf Único fragmento válido producto de la entrada.

	Caso de Prueba 1	Caso de Prueba 2	Caso de Prueba 3
Peso Molecular	X	X	X
Dadores de H	X	X	X
Recibidores de H	X	X	X
ClogP	X	X	X

TABLA 4.1. Trazabilidad Casos de Prueba / Implementaciones

Capítulo 5

Conclusiones

5.1. Conclusiones

En este proyecto, se ha decidido por la utilización de un enfoque de deconstrucción-reconstrucción por varios motivos, uno de ellos es la fuerza e importancia que ha tomado este enfoque, por la fiabilidad de sus predicciones. Sin embargo este proceso de deconstrucción-reconstrucción, incluyendo la fragmentación de ligandos, actualmente es en gran parte manual [7].

Obteniendo resultados, se obtenido que es posible una fragmentación computacional de ligandos, implementando las reglas RO3 y restricciones respectivas(cíclos). Las reglas RO3 deben ser respetadas para obtener fragmentos que sean potencialmente viables para una posterior sintetización por parte de equipos químicos. Al obtener estos resultados, se demuestra que es factible una fragmentación computacional de ligandos utilizando el enfoque de Deconstrucción-Reconstrucción propuesto.

También se han obtenido resultados concluyentes, de que es posible fragmentar ligandos de interacción afín a la HSP-90 En materia de trazabilidad. Los avances en cuanto a la trazabilidad de tareas/objetivos específicos, se ven reflejados dada la siguiente matriz de trazabilidad de la tabla (Tabla 5.1).

	Tarea 1	Tarea 2	Tarea 3	Tarea 4
Objetivo 1	X			
Objetivo 2			X	X
Objetivo 3		X		

TABLA 5.1. Matriz de trazabilidad Objetivos vs Tareas

	Cumple
Objetivo Específico 1	OK
Objetivo Específico 2	OK
Objetivo Específico 3	OK

TABLA 5.2. CheckList de objetivos específicos y su cumplimiento

5.1.1. Cumplimiento de objetivos. El cumplimiento de los objetivos específicos se da en base a la Tabla 5.2

5.1.1.1. Diseño algoritmo de fragmentación. Se ha diseñado e implementado un algoritmo para la fragmentación de ligandos, centrándose únicamente en la evaluación de las reglas RO3, siendo estas evaluadas para cada fragmento producto de las salidas del algoritmo, determinando si las salidas son válidas o no.

5.1.1.2. Obtención de librería fragmentos. En cuanto a la creación de una librería de fragmentos, se ha utilizado en el algoritmo un enfoque de deconstrucción reconstrucción, en el cual se ha obtenido un 100 % más de fragmentos viables que las soluciones actuales, puesto que los fragmentos obtenidos son evaluados según RO3 y se tiene que los fragmentos clasificados como "válidos", son viables en cuanto a una posterior sintetización.

5.1.1.3. Optimización del Algoritmo. Uno de los objetivos específicos de este proyecto, consiste en disminuir el costo computacional de la construcción de la librería de fragmentos en un 20 %. Este objetivo ha sido cumplido, pasando de un promedio de 0,74 segundos por molécula fragmentada, a un promedio de 0,16 segundos, superando con creces el 20 % propuesto.

5.1.2. Preguntas de Investigación.

- Considerando construir una base de datos de fragmentos con las peores interacciones energéticas en el sitio objetivo, ¿Cómo afecta el tener esta información, en nuevas iteraciones del algoritmo?

Esta información afecta considerablemente, ya que según RO3, los fragmentos que no cumplan quedan descartados. De tal forma, se sabe a posteriori, cuáles son los fragmentos de moléculas que no deben ser evaluados ni fragmentados. Sin embargo

para esto, es necesario adaptar el algoritmo para considerar dicha base de datos de fragmentos.

- Disminuyendo el costo computacional para armar la librería de fragmentos, ¿Es posible encontrar un mayor número de ligandos candidatos?

El número de ligandos candidatos es independiente a la cantidad de fragmentos. Lo importante es que estos fragmentos sean afines, y para eso se implementa RO3 y se utilizan ligandos conocidos de la HSP-90.

5.1.3. Objetivo General. Como conclusión final, se ha determinado que se han cumplido la totalidad de los objetivos específicos, por ende, es contundente afirmar que el objetivo general de: "Desarrollo de un algoritmo de fragmentación de ligandos utilizando un enfoque FBDD para construir una librería de fragmentos", ha sido cumplido.

Bibliografía

- [1] L. Ferreira, R. Dos Santos, G. Oliva, A. Andricopulo. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20:13384-13421, 2015.
- [2] G. Wilson, M. Lill. Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. *Future Med Chem*, Apr;3:735-50. 2011
- [3] What is a Ligand in Cell Biology? <https://study.com/academy/lesson/what-is-a-ligand-in-cell-biology.html>
- [4] papel de la chaperona Hsp90 en control del ciclo celular y senescencia <http://www.cabd.es>
- [5] HSP90 empowers evolution of resistance to hormonal therapy in human breast cancer models <http://www.pnas.org/content/111/51/18297>
- [6] Ingo Muegge Matthias Rarey . *Reviews in Computational Chemistry, Volume 17. Chapter 1: Small Molecule Docking and Scoring*, 17. 2001
- [7] H. Chen, X. Zhou, A. Wang, Y. Zheng , Y. Gao , J Zhou. Evolutions in fragment-based drug design: the deconstruction-reconstruction approach. *Drug Discov Today*. 2015 Jan;20(1):105-13. 2015
- [8] M. Baroni, G. Costantino, G. Cruciani, D. Riganelli, R. Valigi, S. Clementi. Generating optimal linear pls estimations (Golpe) – an advanced chemometric tool for handling 3D-QSAR problems. *Quant. Struct.–Act. Relat.* 12(1), 9–20. 1993
- [9] Y. Tanrikulu, G. Schneider. Pseudoreceptor models in drug design: bridging ligand- and receptor-based virtual screening. *Nat. Rev. Drug Discovery* 7(8), 667–677 . 2008
- [10] J. Blaney, J. A very short history of structure-based design: How did we get here and where do we need to go? *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2012, 26, 13–14 2012
- [11] Mandal, S.; Moudgil, M.N.; Mandal, S.K. Rational drug design. *Eur. J. Pharmacol.* 625, 90–100. 2009
- [12] Leonardo G. Ferreira, Ricardo N. dos Santos, Glaucius Oliva, Adriano D. Andricopulo. Review Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, 20. 13385-13386. 2015
- [13] Durrant, J.D.; McCammon, J.A. Computer-aided drug-discovery techniques that account for receptor flexibility. *Curr. Opin. Pharmacol*, 10, 770–774 2010
- [14] Huang, S.Y.; Zou, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 3016–3034 2010
- [15] E. Yuriev, M. Agostino, P. Ramsland. Challenges and advances in computational docking: *J. Mol. Recognit.* 24, 149–164. 2011

- [16] D.K. Agrafiotis, A.C. Gibbs, F. Zhu, S. Izrailev, E. Martin. Conformational sampling of bioactive molecules: A comparative study. *J. Chem. Inf. Model.* 47, 1067–1086. 2007
- [17] Z. Zsoldos, D. Reid, A. Simon, S.B. Sadjad, A.P. Johnson. eHiTS: A new fast, exhaustive flexible ligand docking system. *J. Mol. Graph. Model.* 26, 198–212. 2007
- [18] R. Dias, J. de Azevedo, F. Walter. Molecular docking algorithms. *Curr. Drug Targets.* 9, 1040–1047 2008
- [19] W.P. Jencks. On the attribution and additivity of binding energies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4046–4050 1981
- [20] D.A. Erlanson, et al. Tethering: fragment-based drug discovery. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 199–223 2004
- [21] A. Schuffenhauer. Library design for fragment based screening. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 751–762 2005
- [22] R.A. Glennon. Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the ‘deconstruction-reconstruction-elaboration’ approach. *Mini Rev. Med. Chem.* 5, 927–940 2005
- [23] M. Congreve. Recent developments in fragment-based drug discovery. *J. Med. Chem.* 51, 3661–3680 2008
- [24] M. Vieth. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *J. Med. Chem.* 47, 224–232 2004
- [25] A. Ciulli. Probing hot spots at protein–ligand binding sites: a fragment based approach using biophysical methods. *J. Med. Chem.* 49, 4992–5000 2006
- [26] I. Krimm. Binding evaluation of fragment-based scaffolds for probing allosteric enzymes. *J. Med. Chem.* 55, 1287–1295 2012
- [27] H. Chen. Combined bioinformatics and chemoinformatics approach for developing asymmetric bivalent AMPA receptor positive allosteric modulators as neuroprotective agents. *ChemMedChem* 8, 226–230 2013
- [28] H. Jhoti. The ‘rule of three’ for fragment-based drug discovery: where are we now? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 644–645 2013
- [29] N.M. O’Boyle, C. Morley and G.R. Hutchison. Pybel: a Python wrapper for the OpenBabel cheminformatics toolkit. *Chem. Cent. J.* , 2, 5. 2008
- [30] N M O’Boyle, M Banck, C A James, C Morley, T Vandermeersch, and G R Hutchison. .open Babel: An open chemical toolbox.” *J. Cheminf.* 3, 33. (2011)